

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/07464

25.10.00

REC'D 15 DEC 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年10月26日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第303212号

出願人
Applicant (s):

昭和電工株式会社

JP00/7464

3 ENU

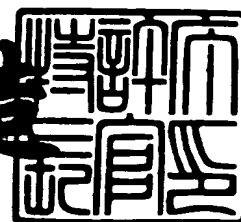
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3099147

【書類名】 特許願

【整理番号】 11H110276

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 丁目 1 番 1 号 昭和電工株式会社 総合研究所内

 【氏名】 青木 裕史

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 丁目 1 番 1 号 昭和電工株式会社 総合研究所内

 【氏名】 蒲池 晴美

【特許出願人】

 【識別番号】 000002004

 【氏名又は名称】 昭和電工株式会社

 【代表者】 大橋 光夫

【代理人】

 【識別番号】 100094237

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 矢口 平

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 010227

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9702281

【プルーフの要否】 要

【書類名】

明細書

【発明の名称】

微生物によるカルボン酸類の製法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ニトリル化合物の 1 個のシアノ基を、微生物を用いてカルボキシル基に変換しカルボン酸類を製造する方法において、シアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物を用いることを特徴とするカルボン酸類の製法。

【請求項 2】 上記変異微生物がロドコッカス属微生物の変異株である請求項 1 に記載のカルボン酸類の製法。

【請求項 3】 上記ロドコッカス属微生物の変異株がロドコッカス sp. ATCC39484 を親株とする変異株である請求項 2 に記載のカルボン酸類の製法。

【請求項 4】 ロドコッカス s p. ATCC39484 を親株とする変異株がロドコッカス s p. SD826 (FERM P-17598) である請求項 3 に記載のカルボン酸類の製法。

【請求項 5】 ニトリル化合物が分子内に複数のシアノ基を有するポリニトリル化合物であり、カルボン酸類がシアノカルボン酸類である請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の高純度カルボン酸類の製法。

【請求項 6】 ポリニトリル化合物が芳香属ポリニトリル化合物であり、シアノカルボン酸類が芳香属シアノカルボン酸類である請求項 5 に記載の高純度カルボン酸類の製法。

【請求項 7】 芳香属ポリニトリル化合物が o - フタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、芳香族シアノカルボン酸類が対応する o - シアノ安息香酸、m - シアノ安息香酸または p - シアノ安息香酸である請求項 6 に記載のカルボン酸類の製法。

【請求項 8】 シアノ基をカルボキシル基に変換する能力を有し、かつシアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物。

【請求項 9】 変異微生物がロドコッカス属微生物の変異株である請求項 8 に記載の変異微生物。

【請求項 10】 変異微生物がロドコッカス s p. ATCC39484 の変異株であ

る請求項 9 に記載の変異微生物。

【請求項 1 1】 ロドコッカス s p . S D 8 2 6 (F E R M P - 1 7 5 9 8) 株。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【産業上の利用分野】

本発明により得られるカルボン酸類、特にシアノカルボン酸類は、医薬、農業、染料、その他化学品の合成原料として有用である。

【 0 0 0 2 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物の作用によりニトリル化合物のシアノ基を加水分解し対応するカルボン酸類を製造する方法に関する。

【 0 0 0 3 】

【従来の技術】

ニトリル化合物のシアノ基を加水分解し対応するカルボン酸類を得る反応は、簡便にカルボン酸類を得る方法として種々検討がなされている。

【 0 0 0 4 】

1 分子中に複数のシアノ基を含むポリニトリル化合物の、一部のシアノ基のみを生物的に加水分解し、対応するシアノカルボン酸を得る反応、特に、芳香族ポリニトリル化合物の特定のシアノ基のみを選択的に加水分解することにより、芳香族シアノカルボン酸類を得る方法について、微生物の反応の特異性を生かした反応が多数報告されている。例えば米国特許第 4,629,700 号では、ロドコッカス (Rhodococcus) 属の微生物を用いた、フタロニトリル類からシアノ安息香酸類の製法が開示されている。また例えば欧州特許第 178,106 号では、ロドコッカス (Rhodococcus) 属を含む 4 属のグラム陽性細菌を用いた、ポリニトリル化合物からの選択的シアノ基加水分解によるシアノカルボン酸類、及びシアノカルボン酸アミド類の製法が開示されている。

【 0 0 0 5 】

このような選択的シアノ基加水分解反応を、化学合成的に実施するためには、特定のシアノ基の保護など複雑な手順が必要であり、実用的ではない。

【0006】

一般に選択性が高いといわれる生物的反応も、詳細に検証すれば、厳密には副反応による不純物を伴っている場合が多い。例えば上記のロドコッカス属微生物を用いたフタロニトリルからシアノ安息香酸の製法においては、選択率は100%ではなく、いずれも、1.0%から数%の、フタロニトリル由来の副生物を伴っている。これらは原料からの転換率としては優れた方法と言えるが、特に医薬合成や、精密有機合成の出発原料としてみた場合、わずかな副生物の挙動が、結果的にそれを原料として合成された物質の性能や安全性に大きく影響する場合が少なくないことを考慮すれば、十分とは言えないものである。

【0007】

製品の純度を高めるための方法として、産物を取得後、さらに精製を加えることが考えられる。しかしながら、例えば芳香族ポリニトリルから生物的にシアノカルボン酸を生成する過程で産生する種々の副生物は、相互に沸点、疎水度などの物性値が酷似しており、通常用いられる蒸留や抽出、塩析といった精製方法では完全には分離され難い。

【0008】

このように、従来のニトリル化合物の微生物を用いた加水分解反応によってカルボン酸類を製造する方法において、加水分解反応そのものの選択率は十分ではなく、副生物の生成量が十分低減されているとはいえない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような背景から、ニトリル化合物のシアノ基を微生物を用いて加水分解し対応するカルボン酸類を製造する方法において、従来よりも高い収率の加水分解反応で副生物の量を低減したカルボン酸類の製法を提供すること、さらにポリニトリル化合物の特定のシアノ基のみを選択的に加水分解し対応するシアノカルボン酸類を製造する方法において、従来よりも高い収率の加水分解反応で副生物の量を低減したシアノカルボン酸類の製法を提供することを課題とする。本発明の他の目的は、上記反応を触媒する変異微生物を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

発明者らは、従来の微生物によるシアノ基の加水分解反応の副反応による副生物の本質的な低減を目指し鋭意検討を重ねた。特に、フタロニトリル類から、シアノ安息香酸類を生成する公知の様々な手法において生じる副生物を詳細に解析した結果、この反応による主要な副生物は、シアノベンズアミド、ならびにシアノベンズアミドから更に加水分解されたフタル酸モノアミドであることを見いだした。さらに、ニトリルをアミドに変換する能力を欠損または低下させた微生物を同反応に用いることにより、これら副生物を大幅に低減することができることを見いだした。

【0011】

例えば小林らの報告（日本農芸化学会誌 Vol.71, No.12, 1997）などにより、微生物がニトリル化合物をカルボン酸まで加水分解する経路としては、ニトリラーゼによる一段階の反応経路と、ニトリルヒドラターゼとアミダーゼの二つの酵素による、一旦アミド体を經由する二段階の反応経路、の2種類が存在することが知られている。

【0012】

発明者らは、公知のニトリル変換微生物であるロドコッカス エスピーATCC39484を用いて、本菌株がポリニトリル化合物をシアノカルボン酸に変換する反応経路に関する詳細な検討を行った。本菌株は菌体懸濁反応により、フタロニトリルから主産物としてシアノ安息香酸を生成するが、同時に副生物としてシアノベンズアミド、ならびにフタル酸モノアミドを生成することを確認した。さらに検討の結果、本微生物のフタロニトリル加水分解には前記の2種類の経路の両方が拮抗して機能していることが推測された。そして、通常、ニトリルの加水分解によるカルボン酸生成に有用と考えられてきたアミド経路の活性をむしろ欠損または低下することで、問題の副生物であるシアノベンズアミド、ならびにシアノベンズアミドから更に加水分解されたフタル酸モノアミドを同時に削減または低減できるとの考えに至った。

【0013】

ATCC39484株を親株として、NTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) を用い常法に従い変異株集団を作成した。前述の、アミド体を經由する二段階経路が、一連の制御を受けているとの仮定に基づき、ベンズアミドを唯一炭素・窒素源として生育しないことを指標に、これら変異株集団より鋭意スクリーニングを行った。多数の非生育株を取得し実際に表記反応に供した結果、フタロニトリルとの反応においてシアノベンズアミド、ならびにフタル酸モノアミドの生成が著しく低減された微生物、SD826株を取得したことで本発明を完成した。

【0014】

すなわち本発明は、以下に示す事項である。

〔1〕 ニトリル化合物の1個のシアノ基を、微生物を用いてカルボキシル基に変換しカルボン酸類を製造する方法において、シアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物を用いることを特徴とするカルボン酸類の製法。

〔2〕 上記変異微生物がロドコッカス属微生物の変異株である〔1〕に記載のカルボン酸類の製法。

〔3〕 上記ロドコッカス属微生物の変異株がロドコッカスsp. ATCC39484を親株とする変異株である〔2〕に記載のカルボン酸類の製法。

〔4〕 ロドコッカスsp. ATCC39484を親株とする変異株がロドコッカスsp. SD826 (FERM P-17598) である〔3〕に記載のカルボン酸類の製法。

〔5〕 ニトリル化合物が分子内に複数のシアノ基を有するポリニトリル化合物であり、カルボン酸類がシアノカルボン酸類である〔1〕～〔4〕に記載の高純度カルボン酸類の製法。

【0015】

〔6〕 ポリニトリル化合物が芳香属ポリニトリル化合物であり、シアノカルボン酸類が芳香属シアノカルボン酸類である〔5〕に記載の高純度カルボン酸類の製法。

〔7〕 芳香属ポリニトリル化合物がo-フタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、芳香族シアノカルボン酸類が対応するo-シアノ安息香酸、m-シアノ安息香酸またはp-シアノ安息香酸である〔6〕に

記載のカルボン酸類の製法。

[8] シアノ基をカルボキシル基に変換する能力を有し、かつシアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物。

[9] 変異微生物がロドコッカス属微生物の変異株である[8]に記載の変異微生物。

[10] 変異微生物がロドコッカス s p. ATCC39484の変異株である[9]に記載の変異微生物。

[11] ロドコッカス s p. S D826 (FERM P-17598) 株。

【0016】

なお、上記変異株 ロドコッカス s p. S D826は、公知微生物であるロドコッカス s p. ATCC39484 (米 American Type Culture Collectionより分譲) から発明者らにより創出された変異微生物であり、工業技術院生命工学研究所に生命研寄託第FERM P-17598号として寄託されているものである。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下本発明について詳細に説明する。

【0018】

本発明に用いられる、シアノ基を加水分解しアミド基に変換する能力を欠損または低減せしめた変異微生物を創製するための親株としては、一般に知られる、ニトリル化合物のシアノ基を加水分解する能力を持つ種々の微生物、特に、ニトリラーゼ活性を有し、なおかつニトリル化合物の水和反応によるカルボン酸生成反応における副生物がアミド体であるような微生物を用いることができる。ニトリル加水分解能を有することが知られる微生物の例としては、ロドコッカス (Rhodococcus)、ロドトルラ (Rhodotorulla)、フザリウム (Fusarium)、シュードモナス (Pseudomonas)、アシネトバクター (Acinetobacter)、バチルス (Bacillus)、ブレビバクテリウム (Brevibacterium)、クレブシエラ (Klebsiella)、マイクロコッカス (Micrococcus)、パークホルデリア (Burkholderia)、コリネバクテリウム (Corynebacterium)、ノカルディア (Nocardia)、アエロモナス (Aeromonas)、アグロバクテリウム (Agrobacterium)、アクロモバクター (Achromobacter)、アスペルギ

ルス (Aspergillus)、リゾビウム (Rhizobium) 等の各属に属する微生物がある。

【0019】

例えばロドコッカス s.p. ATCC39484株を、通常知られるような微生物の培養方法にて培養し、得られた菌体にNTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、EMS (エチルメタンスルホン酸) 等のアルキル化剤、5-ブロモウラシル等の塩基アナログ、アザセリンやアクリジンオレンジ等のインターカラーション剤など、一般に知られる変異誘起化合物、または紫外線を作用させ、変異微生物集団を調製する。この変異微生物集団より、ニトリル化合物からアミド化合物を生成する能力が低下あるいは欠損した変異株を選抜する。変異株が、アミド化合物を生成する能力を低下あるいは欠損していることは、変異微生物株の培養菌体をニトリル化合物に作用させ、得られた生成物を、HPLC等の分析方法により解析し、ニトリル化合物の分解に伴う対応するカルボン酸アミド体の生成の状況を観察することで知ることができる。

【0020】

この際、発明者らは、膨大な変異微生物集団より、目的とする変異株を効果的に濃縮するため、アミド体を経由する二段階経路が一連の制御を受けているとの仮定に基づき、親株とした微生物が栄養源として生育することができるようなアミド化合物、例えばATCC39484を親株とした場合にはベンズアミド等、を資化し生育する能力の欠失もしくは低下を以て、アミドを経てカルボン酸に至る一連の反応経路の欠損または低下の指標とすることを考案した。この指標に基づく種々の方法により、目的の変異微生物を変異微生物集団より効率的に濃縮することが可能となった。

【0021】

なお本発明において、アミド化合物を資化し生育する能力を欠損もしくは低下とは、同一のアミド化合物を栄養源とした培養における微生物の倍加時間が、親株と比較し概ね2倍以上に延長、もしくは全く生育できなくなることを意味する。例えば、変異微生物集団を通常の栄養寒天培地、例えば、LB寒天培地等に塗抹し、生じたコロニーを個別に、ベンズアミドを唯一炭素・窒素源とする寒天培地に移植し、そこでの生育の良否を目視観察することで、ベンズアミド資化能の変

化した変異株を検知することができる。また、いわゆるペニシリンスクリーニング法を適用し、ベンズアミドによる生育能が欠損または低下した変異微生物を濃縮することができる。すなわち、ベンズアミドを唯一炭素・窒素源とした培地に、微生物が分裂、増殖する過程に作用し微生物を死滅させるような薬剤、例えばペニシリンを添加し、そこに変異微生物集団を接種し培養することで、ベンズアミドで良好に生育する株が死滅し、ベンズアミドを資化し生育する能力の欠失もしくは低下した株が濃縮される。こうして濃縮された一群の変異微生物について、それぞれ、培養菌体をニトリル化合物、例えばATCC39484を親株とした場合にはフタロニトリルに作用させ、得られた生成物を、HPLC等の分析方法により解析し、カルボン酸アミド体の蓄積が低減された株を探索する。このようにして濃縮された一群の変異微生物中には、カルボン酸アミド体の蓄積が増大した株とともに、蓄積が低減された株が見いだされる。

【0022】

このようにして創出された変異株の一例として、ロドコッカス *s p.* SD826株を挙げることができる。ロドコッカス *s p.* SD826株は、公知微生物であるロドコッカス *s p.* ATCC39484（米 American Type Culture Collectionより分譲）から発明者らにより創出された株であり、工業技術院生命工学研究所に生命研寄託第FERM P-17598号として寄託されているものである。

【0023】

本発明の反応は、前記のごとく創出された変異微生物を用い、通常のシアノ基加水分解活性を持つ微生物によるカルボン酸生成反応と同様の、一般的な微生物を用いた変換反応として実施することができる。例えば、SD826株を1%ペプトンなどの栄養培地で、20℃～40℃、望ましくは25℃～30℃の温度で24時間程度培養し、得られた培養液に、ニトリル化合物を1ppm～50%、望ましくは10ppm～10%添加し、引き続き同様の温度で1時間～200時間程度攪拌し続けることにより達せられる。なお添加されるニトリル化合物は必ずしも全量が溶解していなくてもよいが、反応液中での溶解性や分散性を改善するような溶媒、界面活性剤等を添加することもできる。また反応の進行によるニトリル化合物の消費に応じて、連続的あるいは間欠的にニトリル化合物を添加してもよく、この場合のニトリル化合

物の反応液中濃度は前記の限りではない。

【0024】

微生物を培養するための培地炭素源としては、グルコースやシュクロース、フルクトース、蔗糖等の糖類、エタノールや酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、安息香酸、脂肪酸などの有機物又はこれらのアルカリ金属塩、n-パラフィンなどの脂肪族炭化水素類、芳香族炭化水素類、また例えばペプトン、肉エキス、かつおエキス、大豆粉、ふすま等の天然有機物を、単独、あるいはこれらの組み合わせにより、通常0.01%~30%、望ましくは0.1%~10%程度の濃度で用いることができる。

【0025】

微生物を培養するための培地窒素源としては、例えば硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの無機窒素化合物、また尿素、尿酸などの含窒素有機物、ペプトン、肉エキス、魚エキス、大豆粉、等の天然有機物を単独、あるいはこれらの組み合わせにより、通常0.01%~30%、望ましくは0.1%~10%程度の濃度で用いることができる。またこれら菌株によりシアノ基が加水分解を受けカルボン酸となるような反応原料は、培養中にあらかじめ添加しておくことにより、反応の進行と共に加水分解により遊離するアンモニウムイオンが微生物の窒素源となることから有用である。

【0026】

さらに必要に応じて、リン酸2水素カリウム等のリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、酢酸カルシウム、塩化マンガン、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、硫酸ニッケルなどの金属塩が菌の生育改善のために添加される。添加濃度は培養条件により異なるが、通常、リン酸塩に関しては0.01%~5%、マグネシウム塩においては10ppm~1%、他の化合物では0.1ppm~1000ppm程度である。また選択する培地により、ビタミン類、アミノ酸、核酸などの供給源として例えば酵母エキス、カザミノ酸、酵母核酸を1ppm~100ppm程度添加することにより、菌の生育を改善することができる。

【0027】

また、菌のシアノ基に対する反応性を向上するために、シアノ基加水分解酵素

の誘導源として培養中にニトリル化合物、例えばベンゾニトリルなどを10ppm～1%添加することは有用である。さらに、誘導源をかねて、反応原料となるニトリル化合物を、培養開始時点から添加しておくことも有用である。

【0028】

いずれの成分を用いた場合も培地のpHは、5～9、望ましくは6～8に調整されることが望ましい。また以上のごとき培地であらかじめ培養された微生物菌体を、遠心分離、膜ろ過などの方法により培養液から分取し、反応原料であるニトリル化合物を含む水、生理食塩水、または培養のpHと同様に調整されたリン酸、酢酸、ホウ酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンなどとこれらの塩よりなる緩衝液等に再度懸濁し、反応することは、反応液中の夾雑物を低減し、のちの生成物の分取を簡便にするために有用である。反応中のpHは、十分な濃度の緩衝液を用いる場合においては通常維持されうるが、反応の進行により上記pHを逸脱する場合においては、水酸化ナトリウム、アンモニアなどを用い適宜調整することが望ましい。

【0029】

反応液中に生成したシアノカルボン酸は、その反応液中での性状により、遠心分離、膜ろ過、減圧乾燥、蒸留、溶媒抽出、塩析、イオン交換、各種クロマトグラフィーなど通常用いられる方法で分取される。最も簡便には、反応液を酸性に調整することによりシアノカルボン酸を析出させ、沈殿を遠心分離またはろ過することにより回収することができる。なお反応生成物が水溶液として得られる場合は、生成物が溶解した条件下で、遠心分離、膜ろ過などの方法により、微生物菌体を除去しておくことが好適である。また反応生成物が固形物として得られる場合は、結晶が十分に大きい場合はステンレス、ナイロン等のメッシュを用いて生成物を分取することができる。結晶が微生物との分別が困難な程度に微少な場合は、それらが溶解するような条件、例えばアルカリ条件下などにより一度水溶液として、遠心分離、膜ろ過等の方法により菌体を除去し、しかる後に条件を回復し再度沈殿させ分取する方法は好適である。ただし反応液の直接蒸留など、微生物が除かれることが自明な手法をとることができる場合においてはこの限りではない。

【0030】

反応生成物の性質によっては、反応液中に生成物が蓄積することにより、反応速度が低下する場合がある。このような場合は、生成物の濃度に応じて反応液中に、水、生理食塩水、反応緩衝液を追加し連続的に希釈してゆく方法は好適である。また反応速度が低下した時点で菌を分取し、上清を生産物溶液として回収し、分取した菌は再度反応原料を含む溶液あるいは懸濁液に戻すことにより、反応速度を回復することができる。これらの方法は、微生物のニトリル加水分解活性が維持される範囲において、何回でも繰り返すことができる。

【0031】

本発明はさらに、本発明に適用の微生物の、無細胞抽出液、さらに無細胞抽出液から上記反応を触媒する成分を濃縮・抽出したもの、等を用いても同様に実施することができる。さらには、本反応に適用可能な微生物もしくはその抽出液、抽出成分を、難溶性の担体に固定化し、この固定化物を原料溶液に接触させることによっても達成される。このような固定化担体としては、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリ-N-ビニルホルムアミド、ポリアリルアミン、ポリエチレンイミン、メチルセルロース、グルコマンナン、アルギン酸塩、カラギーナン等、更にこれらの重合、架橋化物など、微生物もしくはその抽出成分を包合した水難溶性の固形分を形成するような化合物を単独、もしくは混合して用いることができる。また、活性炭、多孔質セラミックス、グラスファイバー、多孔質ポリマー成型体、ニトロセルロース膜など、あらかじめ固形物として形成された物体上に微生物もしくはその抽出液、抽出成分を保持させたものを用いることもできる。

【0032】

本発明の方法によるシアノ基の加水分解反応の基質特異性は広く、通常知られる種々のニトリル化合物、例えば脂肪族ニトリル、芳香族ニトリル、複素環式ニトリル、等を対象とし、高い選択率で対応するカルボン酸を得ることができる。

【0033】

脂肪族ニトリルとしては、例えばアセトニトリル、プロピオニトリル、n-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、n-バレロニトリル、イソバレロニトリル、カ

プロニトリル、マロノニトリル、サクシノニトリル、アジボニトリル、グルコニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等が挙げられる。

【0034】

また芳香族ニトリルとしてはベンゾニトリル、トルニトリル、オルトフタロニトリル、テレフタロニトリル、イソフタロニトリル、及びこれら芳香族ニトリル化合物の置換体、例えば塩素化物、フッ素化物、ニトロ化物、アミノ化物、等が挙げられる。

【0035】

また複素環式ニトリルとしては、3-シアノピリジン、4-シアノピリジン、シアノインドール類、等が挙げられる。

【0036】

また本発明によれば、上記のうち特に1分子中に複数のシアノ基を有するポリニトリル化合物を対象とし、高い選択率で対応するシアノカルボン酸を得ることができる。このようなポリニトリル化合物としては、例えば脂肪族ニトリルとしては、マロノニトリル、サクシノニトリル、アジボニトリル、グルコニトリル等、また芳香族ニトリルとしてはオルトフタロニトリル、テレフタロニトリル、イソフタロニトリル、及びこれら芳香族ニトリル化合物の置換体、例えば塩素化物、フッ素化物、ニトロ化物、アミノ化物等を挙げることができる。

【0037】

本発明の副生物の量を低減したカルボン酸類の製法は、具体的には、生成物であるカルボン酸類中、原料ニトリル化合物に由来する副生物の全量が、0.5（モル）%以下で取得することができる。微量な化学物質が人体に与える影響が懸念されている昨今、化学反応における本質的な副反応の低減、そうした反応によりえられる高純度の化学品が、産業上の新たな可能性を創製しうることを勘案したものである。

【0038】

本発明の方法は、基本的にアミドを経由するカルボン酸の生成経路を欠損あるいは低減していることから、ニトリルの部分加水分解によるアミド体不純物、さらにその誘導体を実質的に生成しない。本発明により得られるカルボン酸類は、

特に高純度が要求される分野、例えば医薬合成やファインケミカル分野の合成原料等の製法として好適である。

【0039】

【実施例】

以下に本発明の実施例を記載する。これら実施例は本発明の範囲を規定するものではない。

【0040】

[実施例1] 変異微生物の取得

ロドコッカス エスピー ATCC39484 (米 American Type Culture Collection より入手) を、LB寒天培地に画線し、30℃恒温槽中で24時間培養した。生じたコロニーより1白金耳掻き取り、LB液体培地5mlに接種、30℃の振盪培養器にて6時間振盪培養した。菌体を10,000gの遠心により回収し、等容の50mM リン酸カリウム/ナトリウム緩衝液(pH7.0)で3回洗浄した後、等容の同緩衝液に再度懸濁した。

【0041】

菌懸濁液に、2000ppm NTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 溶液を、終濃度にして100ppmとなるよう添加しよく攪拌後、室温で30分間放置した。菌体を10,000gの遠心により回収し、同緩衝液で1回洗浄後、菌体を少量の同緩衝液に再度懸濁し、全量を、0.1% ベンズアミドを含む無機塩液体培地5mlに接種した。無機塩培地の組成を以下に示す。

【0042】

(無機塩培地)

KH_2PO_4	1.5	G
Na_2HPO_4	1.5	G
MgSO_4 7aq	0.2	G
CaSO_4 2aq	10	Mg
FeSO_4 7aq	5	Mg
yeast extract	20	Mg /L

【0043】

30℃、1.5時間の振盪培養の後、1mg/Lとなるように、アンピシリンを添加し、更に30℃、12時間振盪培養した。得られた培養液を500倍に希釈し、希釈液を、LB固体培地（直径90mmシャーレ上）に各0.1mlずつ、300枚に塗布した。30℃、48時間培養し、コロニーが生じた段階で、高圧滅菌したベルベットにコロニーを写し取り、各シャーレごとに0.1%ベンズアミド、1.5%寒天を含む上記組成の無機塩固体培地（直径90mm）に転写し、30℃、48時間培養した。

【0044】

転写元のLB固体培地と、転写先の無機塩固体培地でのコロニー形成を比較し、LBで良好に生育し、無機塩固体培地で生育しない約400株を選抜した。これら選抜株を、転写元のLBから、滅菌した爪楊枝にて、新しいLB固体培地に移植し、30℃、24時間培養した。生じた全てのコロニーについてそれぞれ上記の無機塩培地5mlに接種し、さらにイソフタルニトリル0.1%を添加し30℃、48時間反応した。同時に親株ATCC39484についても同様に培養し接種、反応を行った。それぞれの株について得られた反応液の上清を100倍に希釈し、逆相HPLC（カラム：Shodex DS-613、溶離液：50%アセトニトリル／5mMリン酸カリウム緩衝液pH3.0、流速1mL/min、検出：UV 210nm）に供した。うち1株（SD826株）は、親株ATCC39484同様、著量の3-シアノ安息香酸を検出したと同時に、親株の反応液に認められた、3-シアノベンズアミド、ならびにフタル酸モノアミドが顕著に低減していることを確認した。目的とする、副反応経路が欠損した株が得られたと考えられた。

【0045】

[実施例2]

ロドコッカス エスピー SD826を、LB寒天培地に画線し、30℃の恒温槽で24時間培養した。形成されたコロニーから、1白金耳をかきとり、500mL容のバッフル付きフラスコ中のLB液体培地100mLに懸濁した。フラスコを、30℃の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分120回転、24時間培養した。得られた微生物菌体を、10,000gの遠心により回収し、培養液と等容の50mMリン酸ナトリウム／カリウム緩衝液（pH=7）に懸濁した。菌懸濁液にイソフタルニトリルを5%（質量／体積）相当添加し、30℃の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分120回転、72時間反

応した。

【0046】

得られた反応液を、2mol/l塩酸を用いてpH2とし、反応液と等容の酢酸エチルを添加し攪拌、抽出を行った。得られた酢酸エチル層を適宜希釈し、逆相HPLC（カラム：Shodex DS-613、溶離液：50%アセトニトリル/5mMリン酸カリウム緩衝液pH3.0、流速1mL/min、検出：UV 210nm）により分析した。反応液中に主成分として3-シアノ安息香酸標品と保持時間が一致するピークを認めた。ピーク成分を分取し、GC-マスマスペクトル解析に供試し、それぞれ標品と同一の構造を示唆するフラグメントパターンを与えることを確認した。

【0047】

比較例として、上記と同様の方法により、親株ATCC39484株を用いて反応、抽出、分析を行った。親株反応液中の上記HPLC条件下における主要な生成物を、LC-MS分析に供し、同定した。

【0048】

親株及びSD826の反応液中の、主要な各成分の濃度と、反応原料であるイソフタルニトリルからの推定変換率の比較、ならびにATCC39484を基準とした、SD826株の使用による副生物の低減率を表1に示す。

【0049】

【表1】

菌株名	3-シアノ安息香酸		3-シアノ ベンズアミド		イソフタル酸 モノアミド	
	濃度 (%)	変換率 (mol%)	濃度 (%)	変換率 (mol%)	濃度 (%)	変換率 (mol%)
ATCC39484	5.638	98.22	0.023	0.40	0.087	1.34
SD826	5.721	99.67	0.003	0.06	0.016	0.24
副生物の低減率／成分別 (%)			85		82	
副生物の低減率／総計 (%)			83			

【0050】

[実施例3]

ロドコッカス エスピー SD826を、LB寒天培地に画線し、30℃の恒温槽で2

4時間培養した。形成されたコロニーから、1白金耳をかきとり、500mL容のバッフル付きフラスコ中の LB液体培地100mLに懸濁した。フラスコを、30℃の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分120回転、24時間培養した。得られた微生物菌体を、10,000gの遠心により回収し、培養液と等容の50mM リン酸ナトリウム/カリウム緩衝液 (pH=7) に懸濁した。

【0051】

菌懸濁液にテレフタルニトリルを1% (質量/体積) 相当、及び誘導基質としてベンゾニトリルを0.1% (質量/体積) 添加し、30℃の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分120回転、72時間反応した。得られた反応液を、2 mol/l塩酸を用いてpH2とし、反応液をと等容の酢酸エチルを添加し攪拌、抽出を行った。得られた酢酸エチル層を適宜希釈し、逆相HPLC (カラム: Shodex DS-613、溶離液: 50% アセトニトリル/5mMリン酸カリウム緩衝液pH3.0、流速1mL/min、検出: UV 240nm) により分析した。反応液中に主成分として4-シアノ安息香酸標品と保持時間が一致するピークを認めた。ピーク成分を分取し、GC-マススペクトル解析に供試し、それぞれ標品と同一の構造を示唆するフラグメントパターンを与えることを確認した。

【0052】

比較例として、上記と同様の方法により、親株ATCC39484株を用いて反応、抽出、分析を行った。親株反応液中の上記HPLC条件下における主要な生成物を、LC-MS 分析に供し、同定、定量した。

【0053】

親株及びSD826の反応液中の、主要な各成分の濃度と、反応原料であるイソフタルニトリルからの推定変換率の比較、ならびにATCC39484を基準とした、SD826株の使用による副生物の低減率を表2に示す。

【0054】

【表 2】

菌株名	4-シアノ安息香酸		4-シアノ ベンズアミド		テレフタル酸 モノアミド	
	濃度 (%)	変換率 (mol%)	濃度 (%)	変換率 (mol%)	濃度 (%)	変換率 (mol%)
ATCC39484	1.129	98.31	0.006	0.53	0.012	0.97
SD826	1.145	99.68	n. d.	-	0.002	0.26
副生物の低減率／成分別 (%)			100		83	
副生物の低減率／総計 (%)			89			

n.d. : 検出されず

【0055】

【発明の効果】

本発明によれば、ニトリル化合物を原料として、簡便で効率よく高純度カルボン酸類を得ることが出来る。また、ポリニトリル化合物、特に芳香族ポリニトリル化合物を原料として、簡便で効率よく、高純度シアノカルボン酸類を得ることが出来る。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ニトリル化合物のシアノ基を変異微生物を用いて高収率で加水分解しカルボン酸類を製造する方法を提供すること、さらにポリニトリル化合物の特定のシアノ基のみを選択的に高収率で加水分解し対応するシアノカルボン酸類を製造する方法を提供すること。該反応を触媒する変異微生物を提供すること。

【解決手段】 ニトリル化合物のシアノ基を、微生物を用いてカルボキシル基に変換しカルボン酸類を製造する方法において、シアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物を用いることを特徴とするカルボン酸類の製法を提供する。ロドコッカス s p. S D 826 (FERM P-17598) 株を提供する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第303212号
受付番号	59901042976
書類名	特許願
担当官	第八担当上席
作成日	平成11年10月28日
	0097

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成11年10月26日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002004]

1. 変更年月日 1990年 8月27日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都港区芝大門1丁目13番9号
氏 名 昭和電工株式会社